

基于 BDNF/TrkB/p-CREB 信号通路探讨血府逐瘀胶囊促进神经再生防治卒中后抑郁的作用及机制

樊薛津¹, 金博文¹, 杨秋怡¹, 葛士宁¹, 宋 纹², 张 营², 王跃飞¹, 庄朋伟¹, 张艳军^{3,4}, 尹清晟^{1*}, 张密霞^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 天津宏仁堂药业有限公司, 天津 301617

3. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381

4. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300381

摘要: **目的** 探讨血府逐瘀胶囊对卒中后抑郁 (post-stroke depression, PSD) 大鼠抑郁症状的改善作用, 并基于神经再生关键通路脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) /酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase receptor, TrkB) /磷酸化环腺苷酸应答元件结合蛋白 (phosphorylated cAMP response element-binding protein, p-CREB) 探讨其机制。 **方法** 采用短暂大脑中动脉阻塞 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) 复合慢性不可预知应激 (chronic unpredictable mild stimulation, CUMS) 方法复制 PSD 大鼠模型。大鼠随机分为假手术组、模型组及血府逐瘀低、高剂量 (0.43、0.86 g/kg) 组和氟西汀 (1.8 mg/kg) 组, 每组 18 只。连续给予药物干预 28 d, 利用神经功能评分、糖水偏好实验、旷场实验、强迫游泳实验考察血府逐瘀胶囊对 PSD 大鼠神经功能损伤以及抑郁症状的改善作用; 高效液相色谱-电化学检测法检测额叶皮质及海马神经递质多巴胺 (dopamine, DA) 和 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 含量; 免疫荧光染色检测海马 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)、双皮质素 (doublecortin, DCX) 和巢蛋白 (neuroepithelial stem cell protein, Nestin) 表达评价神经再生情况; Western blotting 检测海马 BDNF/TrkB/p-CREB 蛋白表达。 **结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能评分显著提高 ($P < 0.001$), 糖水偏好率显著下降 ($P < 0.05$), 强迫游泳不动时间显著增长 ($P < 0.05$); 前额叶皮质、海马组织 DA 以及海马组织 5-HT 含量明显减少 ($P < 0.05$); BrdU、DCX 阳性细胞数量明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), Nestin 阳性细胞数量减少; 海马 BDNF、TrkB、p-CREB 表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 血府逐瘀胶囊组神经功能评分显著降低 ($P < 0.01$), 糖水偏好率明显升高 ($P < 0.05$), 强迫游泳的不动时间明显减少 ($P < 0.05$ 、 0.01); 前额叶皮质和海马 DA、5-HT 含量均显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01); BrdU、Nestin、DCX 阳性细胞数量明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01); 海马 BDNF 表达有增加的趋势, TrkB、p-CREB 表达均明显增加 ($P < 0.05$)。 **结论** 血府逐瘀胶囊可通过 BDNF/TrkB/p-CREB 通路促进神经再生进而发挥治疗 PSD 作用。

关键词: 血府逐瘀胶囊; 卒中后抑郁; 神经递质; 神经再生; BDNF/TrkB/p-CREB 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)20-6704-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.20.014

Effect and mechanism of Xuefu Zhuyu Capsule on promoting nerve regeneration and preventing post-stroke depression based on BDNF/TrkB/p-CREB signaling pathway

FAN Xue-jin¹, JIN Bo-wen¹, YANG Qiu-yi¹, GE Shi-ning¹, SONG Wen², ZHANG Ying², WANG Yue-fei¹, ZHUANG Peng-wei¹, ZHANG Yan-jun^{3,4}, YIN Qing-sheng¹, ZHANG Mi-xia¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tianjin Hong Ren Tang Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 301617, China

3. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China

收稿日期: 2023-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873192)

作者简介: 樊薛津 (2000—), 女, 汉族, 硕士研究生, 从事中药药理学研究。E-mail: 13302001628@163.com

*通信作者: 张密霞 (1976—), 女, 汉族, 高级实验师, 博士, 主要从事中药药理学研究。Email: mimimixia@sina.com

尹清晟 (1994—), 男, 汉族, 助理研究员, 博士, 主要从事中药药理学研究。Email: carriesable@163.com

4. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300381, China

Abstract: Objective To explore the improvement effect of Xuefu Zhuyu Capsule (血府逐瘀胶囊) on depression symptoms in post-stroke depression (PSD) rats, and explore its mechanism based on the key pathway of neural regeneration [brain derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine kinase receptor B (TrkB)/phosphorylated cAMP response element binding protein (p-CREB)]. **Methods** The rats model of PSD was established by transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) and chronic unpredictable mild stimulation (CUMS). Rats were randomly divided into sham group, model group, Xuefu Zhuyu Capsule low-and high-dose (0.43, 0.86 g/kg) groups and fluoxetine (1.8 mg/kg) group, with 18 rats in each group. Continuous medication intervention was given for 28 d, and the improvement effect of Xuefu Zhuyu Capsule on neurological function damage and depressive symptoms in PSD rats was investigated by neurological function scores, sugar preference experiments, open field experiments and forced swimming experiments; High performance liquid chromatography-electrochemical detection method was used to detect the contents of neurotransmitters dopamine (DA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in frontal cortex and hippocampus; Immunofluorescence staining was used to detect the expressions of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU), doublecortin (DCX) and neuroepithelial stem cell protein (Nestin) in hippocampus to evaluate nerve regeneration; Western blotting was used to detect the expressions of BDNF/TrkB/p-CREB protein. **Results** Compared with sham group, neurological deficit score of rats in model group was significantly increased ($P < 0.001$), the sugar water preference rate was significantly decreased ($P < 0.05$), and duration of forced swimming immobility was significantly increased ($P < 0.05$). The levels of DA in prefrontal cortex and hippocampus and 5-HT in hippocampus were significantly reduced ($P < 0.05$). The number of BrdU and DCX positive cells were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), while the number of Nestin positive cells was decreased. The expressions of BDNF, TrkB and p-CREB in hippocampus were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). Compared with model group, neurological deficit score in Xuefu Zhuyu Capsule group was significantly reduced ($P < 0.01$), the sugar water preference rate was significantly increased ($P < 0.05$), and the immobility time of forced swimming was significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). The levels of DA and 5-HT in prefrontal cortex and hippocampus were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The number of BrdU, Nestin and DCX positive cells were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The expression of BDNF in hippocampus showed an increasing trend, and the expressions of TrkB and p-CREB were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Xuefu Zhuyu Capsule can promote nerve regeneration through BDNF/TrkB/p-CREB pathway and thus exert therapeutic effects on PSD.

Key words: Xuefu Zhuyu Capsule; post-stroke depression; neurotransmitter; neuronal regeneration; BDNF/TrkB/p-CREB signaling pathway

卒中后抑郁 (post-stroke depression, PSD) 是脑血管疾病发生后较常见的精神障碍类并发症。研究表明有近 30% 的患者会在卒中后 5 年内出现抑郁症状^[1], 严重影响患者生活质量且给社会带来了沉重经济负担。目前基于单胺递质学说的抗抑郁药是 PSD 一线治疗药物, 但长期服用会诱发较为严重的安全性问题^[2]。中医认为 PSD 属“郁证”范畴, 病机为素体不足、气滞血瘀, 治法以活血化瘀、行气止痛为主。血府逐瘀缘起于王清任的《医林改错》, 具有活血化瘀、行气止痛之功效。大量临床研究表明血府逐瘀胶囊具有缓解 PSD 患者临床抑郁症状、改善患者生活质量的作用^[3-4], 但具体机制仍需探索。

神经再生障碍是抑郁症的重要病理特征, 促神经再生可减轻焦虑和抑郁样行为。脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 是一类重要的神经营养因子, 在调控神经元增殖、分化、成熟及促神经元再生方面发挥重要作用, 是目前抑郁症研究的核心因子^[5]。BDNF 表达受到包括

环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 反应元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 在内的多种信号调控, 且其活性需与酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase receptor, TrkB) 受体结合^[6-7], BDNF/TrkB 信号传导的激活导致 CREB 的磷酸化。因此, 本研究重点基于 BDNF/TrkB/p-CREB 信号介导的神经再生考察血府逐瘀胶囊改善 PSD 作用机制, 以期为血府逐瘀方临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 90 只, 体重 270~300 g, 购自北京维通利华生物科技有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2016-0006。动物饲养室调节灯光 12 h 昼夜交替, 温度 (24±2) °C, 相对湿度 (35±5) %, 自由进食饮水。动物实验经天津中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 TCM-LAEC2021271)。

1.2 药品与试剂

血府逐瘀胶囊(0.4 g/粒, 批号 BL03223)由天津宏仁堂药业有限公司提供; 氟西汀(批号 H20073985)购自山西仟源医药集团股份有限公司; 多巴胺(dopamine, DA, 批号 D9520)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT, 批号 SA5230)、尼氏染色试剂盒(甲基紫法, 批号 G1432)、DAPI(批号 C0065)、抗荧光淬灭封片剂(批号 S2110)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号 G1120)、驴血清(批号 SL050)均购自北京 Solarbio 公司; 巢蛋白(neuroepithelial stem cell protein, Nestin)抗体(批号 bs-8203R)、双皮质素(doublecortin, DCX)抗体(批号 bs-20797R)购自北京博奥森生物技术有限公司; 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)抗体(批号 AB6326)、Alexa Fluor 488 标记驴抗小鼠二抗(批号 ab150105)、Alexa Fluor 647 标记驴抗兔二抗(批号 ab150075)购自英国 Abcam 公司; β -actin 抗体(批号 AP0060)购自 Bioworld 公司; BDNF 抗体(批号 PB9075)、TrkB 抗体(批号 PB0475)均购自武汉博士德生物有限公司; p-CREB 抗体(批号 AP0019)购自武汉爱博泰克生物技术有限公司; 羊抗兔二抗(批号 A0208)购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器

R500 型通用型小动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司); Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); DM750 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司); Spark 酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

2 方法

2.1 PSD 模型的复制

采用短暂大脑中动脉阻塞(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)联合慢性不可预见温和应激法(chronic unpredictable mild stimulation, CUMS)进行造模^[8-13]。大鼠经异氟烷麻醉后, 分离颈部肌肉, 暴露血管, 分离右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉。从右侧颈内动脉插入线栓向前推进至大脑中动脉, 插入线栓 60 min 后, 缓慢拔除线栓, 恢复供血。假手术组仅做颈外动脉结扎处理。术后第 8 天应激开始, 28 d 内随机接受 7 种不同的应激方式: ①24 h 内大鼠禁食; ②24 h 内大鼠禁水; ③昼夜颠倒; ④潮湿垫料; ⑤水平摇晃; ⑥45°斜笼 24 h; ⑦4℃冰水游泳。每日 1 种, 每

1 种出现 4 次且每种刺激不重复出现^[14]。

2.2 动物分组和给药

将大鼠随机分为假手术组、模型组及血府逐瘀低、高剂量(0.43、0.86 g/kg, 分别相当于 1、2 倍临床等效剂量)组和氟西汀(1.8 mg/kg)组, 每组 18 只。术后第 8 天开始应激并 ig 药物, 假手术组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 28 d。术后经神经功能缺损评分进行重新分组, 最后选取每组 15 只进行后续的实验验证。在 tMCAO 复合 CUMS 造模以及药物治疗过程中, 共有 9 只大鼠死亡。

2.3 神经功能评分

于大鼠应激第 28 天, 采用 Longa 神经功能评分^[15]评定大鼠神经功能缺损。

2.4 行为学检测

于大鼠开始应激后第 29 天, 进行糖水偏好实验、旷场实验、强迫游泳实验。

2.4.1 糖水偏好实验 各组大鼠在应激后第 29 天进行糖水偏好实验^[16], 并计算糖水偏好率。

糖水偏好率 = 糖水消耗量 / (纯水消耗量 + 糖水消耗量)

2.4.2 旷场实验 旷场实验采用开口的观察盒(100 cm×100 cm×40 cm)并用与大鼠毛色相反的颜色覆盖满内壁, 将底部分为 25 等份的方块。把大鼠置于观察盒底的中央部分(50 cm×50 cm)适应 1 min, 然后开始测试, 用摄像机记录 5 min 内总距离和直立次数^[17]。

2.4.3 强迫游泳实验 强迫游泳实验通过圆柱形透明 Pyrex 游泳筒完成, 筒高 40 cm, 筒底部直径 20 cm, 水深 30 cm, 水温 23~25℃, 记录 6 min 内大鼠静止不动行为的时间评价大鼠的绝望行为^[16,18]。

2.5 HPLC 检测大鼠前额叶皮质及海马 DA 和 5-HT 含量

2.5.1 样品制备 将各组大鼠麻醉, 心脏灌流后, 迅速断头取脑, 放置在冰盒上, 迅速剥离出脑组织, 剥离出前额叶皮层、海马。组织称定质量后, 以 10 μ L/mg 比例加入 0.1 mol/L 高氯酸溶液, 4℃、14 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 置于冰上备用。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取 10 mg DA 和 10 mg 5-HT, 分别添加高氯酸定容至 10 mL, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 取滤液备用。

2.5.3 色谱条件 Waters 反相 C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.5 mm, 5 μ m); 流动相为 10%乙腈-90%缓冲盐溶液(含醋酸钠 0.041 mol/L、柠檬酸 0.025 mol/L、辛烷磺酸钠 0.92 mmol/L、EDTA-2Na 0.001 2

mmol/L); 柱温 35 ℃; 体积流量 1 mL/min; 进样体积 10 μ L。

2.5.4 DA 和 5-HT 含量测定 采用标准曲线回归方程及相关系数进行含量计算。

2.6 血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠神经再生的影响

2.6.1 免疫荧光检测新生神经元数量 行为学实验结束后, 各组大鼠麻醉后心脏灌流, 迅速剥离大脑, 4%多聚甲醛室温固定 24 h。将标本转入 10 倍体积的 30%蔗糖溶液, 4 ℃脱水至组织沉底, OCT 包埋, 冷冻至 OCT 完全凝固, 使用冷冻切片机切片。取冰冻切片室温放置 30 min, 柠檬酸盐缓冲液热修复 10 min, 0.25% Triton X-100 通透 10 min, 10%驴血清孵育 30 min, 分别滴加一抗 BrdU (1:200)、Nestin (1:200)、DCX (1:200), 4 ℃孵育过夜, 37 ℃复温后, 滴加荧光二抗 (1:1000), 避光孵育 2 h, DAPI 孵育 5 min, 滴加抗荧光淬灭封片剂, 盖玻片封片, 显微镜下观察, 采集图像进行分析。

2.6.2 Western blotting 检测海马 BDNF、TrkB 和 p-CREB 蛋白表达 取海马组织 30 mg, 按 20:1 的比例加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液 600 μ L, 振荡研磨, 冰上裂解 30 min 后, 4 ℃、14 000 r/min 离心 10 min, 取上清, BCA 法测定样品蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5%脱脂牛奶封闭 2 h, 分别加入兔源 β -actin (1:500)、BDNF (1:1000)、TrkB (1:1000) 以及 p-CREB (1:1000) 抗体, 4 ℃孵育过夜, 加入羊抗兔二抗 (1:1000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 5 次, 5 min/次。加入 ECL 化学发光显影液显影后, Image J 软件进行结果分析。

2.7 统计学分析

采用 SPSS25.0 软件进行处理、分析与统计, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, GraphPad Prism 8.0 软件进行数据图形绘制。多组间比较, 若符合正态性检验, 则采

用单因素方差分析, 并采用 Tukey 法进行两两比较, 若不符合则采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。

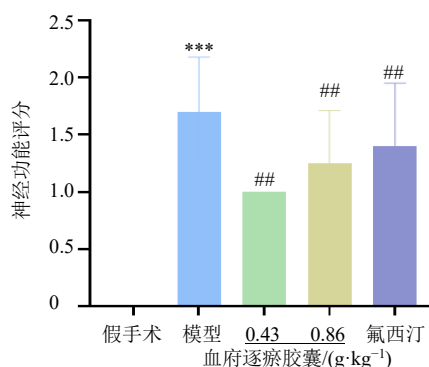
3 结果

3.1 血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠神经功能的影响

如图 1 所示, 在应激 28 d 后, 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能评分显著升高 ($P < 0.001$), 提示造模后大鼠存在神经功能损伤; 与模型组比较, 各给药组大鼠神经功能评分均显著降低 ($P < 0.01$), 表明血府逐瘀胶囊具有改善 PSD 大鼠神经功能损伤的作用。

3.2 血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠抑郁样症状的影响

为考察血府逐瘀胶囊对 PSD 大鼠抑郁样症状的改善作用, 采用糖水偏好、强迫游泳实验、旷场实验来考察 PSD 模型大鼠的抑郁状态, 糖水偏好率越高, 游泳不动时间越短、直立次数越多、总距离越远, 则说明大鼠抑郁症状改善。如图 2 所示, 与



与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

图 1 血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠神经功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Fig. 1 Effect of Xuefu Zhuyu Capsule on neurological function in rats with PSD ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

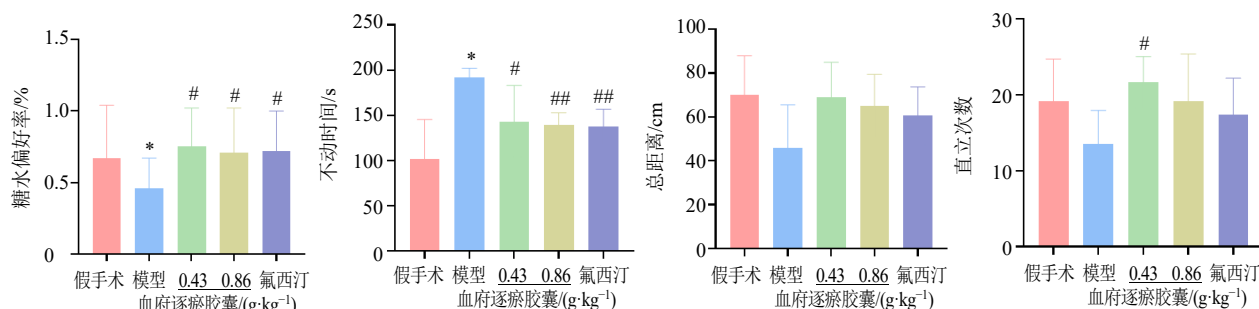


图 2 血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Fig. 2 Effect of Xuefu Zhuyu Capsule on behaviors in rats with PSD ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

假手术组比较, 模型组大鼠糖水偏好率显著下降 ($P<0.05$), 游泳不动时间显著增长 ($P<0.05$), 活动总距离和直立次数有减少趋势, 表明动物出现明显抑郁样症状, PSD 造模成功; 与模型组比较, 各给药组大鼠糖水偏好率明显升高 ($P<0.05$), 游泳不动时间均明显减少 ($P<0.05$ 、 0.01), 旷场运动总距离均有增加的趋势, 但无统计学差异。血府逐瘀胶囊低剂量组大鼠直立次数显著增加 ($P<0.05$), 血府逐瘀胶囊高剂量组和氟西汀组大鼠直立次数有增加的趋势, 但无统计学差异。结果表明血府逐瘀胶囊具有改善 PSD 大鼠抑郁样症状的作用。

3.3 血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠前额叶皮质及海马神经递质含量的影响

脑内单胺类神经递质水平 (如 DA、5-HT) 降低是抑郁症主要病理特征, 因此考察了血府逐瘀胶囊

对 PSD 大鼠脑内神经递质的影响。如图 3 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠前额叶皮质 DA 含量和海马 DA、5-HT 含量均明显降低 ($P<0.05$), 前额叶皮质 5-HT 有降低趋势; 与模型组比较, 血府逐瘀胶囊低剂量组和氟西汀组前额叶皮质 DA、5-HT 含量均显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01), 血府逐瘀胶囊高剂量组和氟西汀组海马 DA 含量均显著增加 ($P<0.05$), 血府逐瘀胶囊低剂量组海马 5-HT 含量显著增加 ($P<0.05$), 表明血府逐瘀胶囊具有增加 PSD 大鼠脑内神经递质含量的作用。

3.4 血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠神经再生的影响

神经再生障碍是抑郁症的重要病理特征, 促神经再生可减轻焦虑和抑郁样行为。因此考察了血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠神经再生的影响。如图 4 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠海马中 DCX、

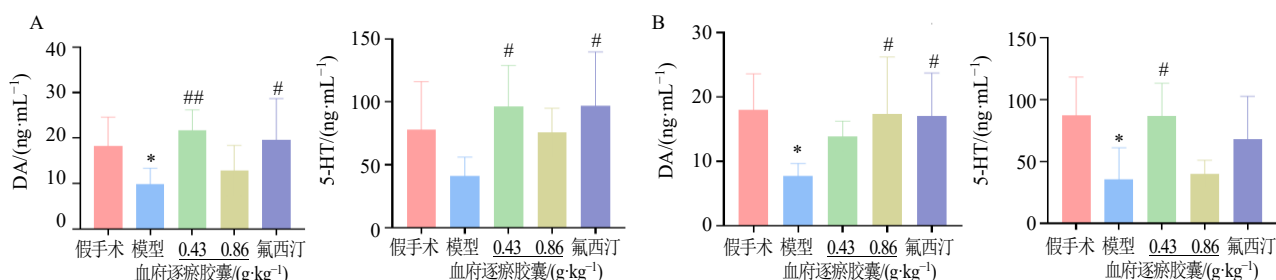


图 3 血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠前额叶皮质 (A) 及海马 (B) 中 DA 和 5-HT 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 3 Effect of Xuefu Zhuyu Capsule on DA and 5-HT contents in prefrontal cortical (A) and hippocampus (B) of rats with PSD ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

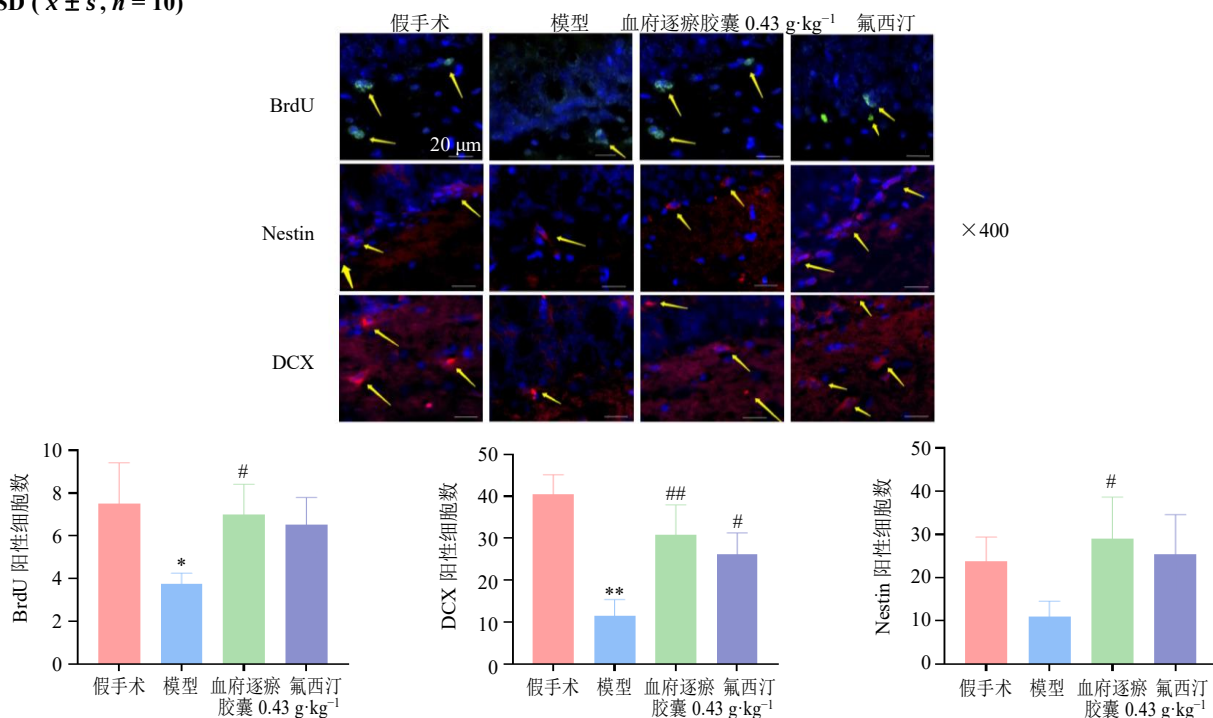


图 4 血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠神经再生的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 4 Effect of Xuefu Zhuyu Capsule on neuronal regeneration in rats with PSD ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

BrdU 的阳性细胞数量显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)，Nestin 的阳性细胞数量有减少趋势；与模型组比较，血府逐瘀胶囊低剂量组 BrdU、Nestin、DCX 阳性细胞数量显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01)，氟西汀组 DCX 阳性细胞数量显著增加 ($P<0.05$)，Nestin 和 BrdU 有所增加。结果表明血府逐瘀胶囊能够促进 PSD 大鼠的海马新生神经元数量增加。

3.5 血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠海马 BDNF、TrkB 和 p-CREB 蛋白表达的影响

BDNF 的表达受到多种信号通路的调节，BDNF

与 TrkB 受体结合后激活相关信号通路，使 CREB 磷酸化，从而调节 BDNF 的表达。如图 5 所示，与假手术组比较，模型组大鼠海马组织 BDNF、TrkB 和 p-CREB 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)；与模型组比较，血府逐瘀胶囊低剂量组 TrkB、p-CREB 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$)，BDNF 表达有增加趋势；氟西汀组 p-CREB 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)，BDNF、TrkB 表达有增加趋势。结果表明血府逐瘀胶囊可通过 BDNF/TrkB/p-CREB 通路对 PSD 大鼠起到治疗作用。

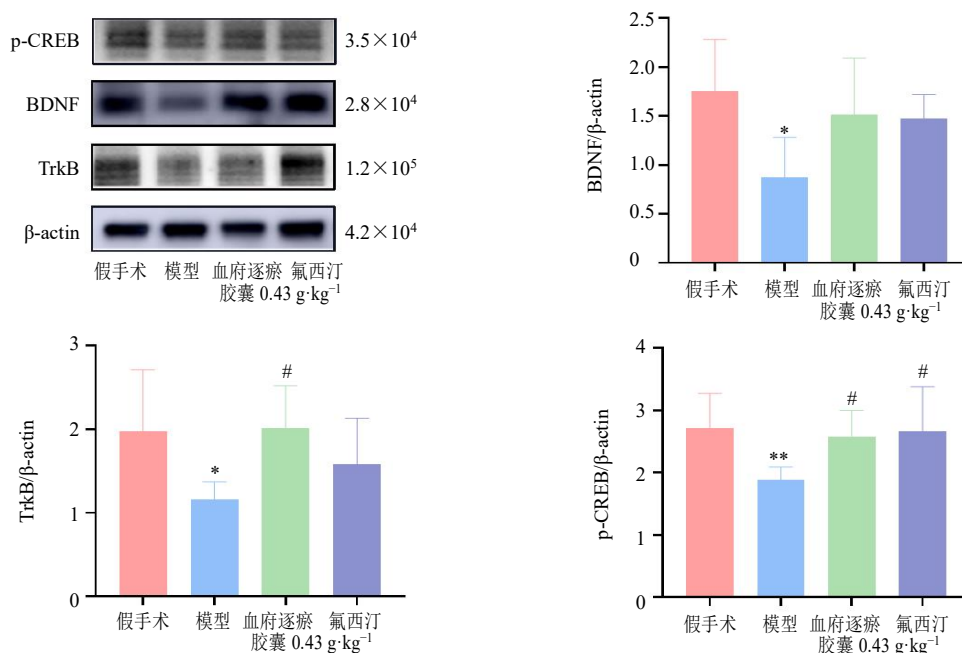


图 5 血府逐瘀胶囊对 PSD 模型大鼠海马组织 BDNF、TrkB 和 p-CREB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of Xuefu Zhuyu Capsule on expressions of BDNF, TrkB and p-CREB proteins in hippocampus of rats with PSD ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

PSD 是一种高发的卒中相关情绪障碍，症状包括情绪低落、快感缺乏、精力丧失、注意力下降、精神迟钝、失眠或嗜睡和内疚等。这些情绪障碍对患者卒中后的预后产生负面影响，患者日常活动依赖性增加、认知较差、社交活动延迟、康复效率降低，降低患者生活质量，增加死亡率^[19-21]。但抑郁症状在卒中幸存者中较为普遍，这与社会关系、健康程度和受教育程度具有一定相关性^[22-23]。PSD 对于中医来说可称之为“中风”和“郁症”的合病。血府逐瘀汤方中君药红花善活血、散瘀以止痛，桃仁善破血、行滞而润燥，红花和桃仁相互配合，增强活血化瘀的力量。川芎善行气活血、祛风止痛；赤芍善清热凉血、散瘀止痛、活血化瘀止痛以助君

药；牛膝长于祛瘀通脉，引瘀血下行，3 药共为臣药。生地黄凉血清热，以除瘀热；枳壳理气宽中疏胸中气滞；当归养血活血润燥，祛瘀生新不伤正；桔梗宣散肺气，以利宽中理气，并载药上行，与枳壳配伍，升降相辅，开胸行气；柴胡疏肝解郁、升举清阳，共为佐药。甘草调和诸药又缓急止痛，其为使药。本方活血行气、祛瘀生新，既解血的瘀滞，又解气的郁结，可作为通治一切血瘀气滞的基础方^[24-26]，是活血理气的代表方药。血府逐瘀胶囊是经过现代制剂及加工工艺制成的中成药，制剂工艺和药效物质相对明确。

本课题组前期研究也发现血府逐瘀胶囊可以通过改善肠屏障功能而间接发挥脑保护防治 PSD 的药效作用^[27]，然而其脑内相关效应机制尚不清楚。

本研究首先通过神经功能评分、行为学、神经递质水平等确认了血府逐瘀胶囊防治 PSD 的药效作用,发现血府逐瘀胶囊明显改善了 PSD 大鼠的神经功能损伤,提高了 PSD 大鼠糖水偏好率,提升了其自主活动能力,明显缩短了 PSD 大鼠的不动时间。“单胺假说”是抑郁症的一个重要假说,它表明 DA、5-HT 和去甲肾上腺素在抑郁症中起着关键作用^[28]。本研究结果表明,PSD 大鼠前额叶皮质以及海马中 DA 和 5-HT 含量均降低,经过血府逐瘀胶囊治疗后明显地恢复,证明在血府逐瘀胶囊干预后可以增加 PSD 大鼠中神经递质的含量。

BrdU 在神经科学研究中经常被用作新分裂细胞的标志,被认为是鉴定神经再生的“金标准”方法^[29]。Nestin 是神经上皮干细胞蛋白,Nestin 表达细胞经常出现在神经再生区域,并且在神经干细胞的自我更新和存活中具有重要作用^[30-31]。DCX 是迁移和分化神经元中包含的微管相关蛋白之一,在发育和成熟中枢神经系统的神经元前体中特异性表达,神经元前体细胞的迁移与 DCX 的表达有关,并且 DCX 在分化的神经元中表达,表明 DCX 在神经元可塑性、轴突生长或合成中都起到重要作用。因此,DCX 经常被用作新生成神经元而非神经胶质细胞的标志^[32-33]。为探究血府逐瘀胶囊在神经再生机制方向的治疗作用,采用免疫荧光检测 BrdU、DCX 和 Nestin 的表达,发现相较于 PSD 大鼠,血府逐瘀胶囊低剂量组以上蛋白表达均有增加,说明血府逐瘀胶囊干预后可增加 PSD 大鼠海马新生神经元数量,为血府逐瘀胶囊治疗 PSD 的神经再生机制探究奠定了基础。

BDNF 通过影响细胞分化、神经元发育、生长和存活、神经发生、突触发生和突触可塑性,在神经系统发育中起关键作用^[34]。研究报道,BDNF 水平降低与脑卒中后抑郁样行为增加之间存在很强的相关性,脑卒中人类患者血清 BDNF 水平降低,因此,BDNF 的表达变化在 PSD 的发生发展中可能起关键作用^[35]。从树突释放的成熟 BDNF 可与特异性受体 TrkB 结合并激活 TrkB 受体,在神经元生长、成熟(分化)和维持中起到重要作用^[36-37]。CREB 是胚胎皮质神经元中 BDNF 诱导基因表达的重要调节因子,参与调节神经元生长发育、突触可塑性和长期记忆形成,CREB 磷酸化激活可抑制细胞凋亡并促进损伤后的细胞分化和修复^[38]。CREB 在 BDNF/TrkB 信号传导被激活后被磷酸化,上调

BDNF 的表达^[39]。这是一种目前广泛认可与抑郁和抗抑郁样反应有关的转录因子。BDNF/CREB 信号被认为是细胞存活、突触结构等许多神经元生物学过程中的关键信号^[40]。本研究通过 Western blotting 检测海马 BDNF、TrkB、p-CREB 蛋白的表达,给予血府逐瘀胶囊干预后发现,海马中 BDNF、TrkB、p-CREB 蛋白的表达相较于模型组大鼠明显升高,表明血府逐瘀胶囊可通过 BDNF/TrkB/p-CREB 通路发挥对 PSD 的治疗作用。

综上,本研究证实了血府逐瘀胶囊对 PSD 的潜在治疗作用。并且发现其可通过 BDNF/TrkB/p-CREB 通路促进神经再生,进而发挥防治 PSD 的作用。本研究对血府逐瘀胶囊的现代研究和临床合理用药具有一定参考价值,并为进一步深入探究血府逐瘀胶囊防治 PSD 的作用机制提供线索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hackett M L, Pickles K. Part I: Frequency of depression after stroke: An updated systematic review and meta-analysis of observational studies [J]. *Int J Stroke*, 2014, 9(8): 1017-1025.
- [2] Das J, Rajanikant G K. Post stroke depression: The sequelae of cerebral stroke [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2018, 90: 104-114.
- [3] 杨华. 血府逐瘀汤加味方对脑卒中后抑郁患者神经评分及睡眠质量的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29(28): 3159-3162.
- [4] 李岩峰. 血府逐瘀汤联合黛力新治疗缺血性脑卒中后伴抑郁的疗效观察 [J]. *内蒙古中医药*, 2020, 39(4): 81-82.
- [5] Björkholm C, Monteggia L M. BDNF—A key transducer of antidepressant effects [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 102: 72-79.
- [6] Ruan J, Liu L, Shan X, et al. Anti-depressant effects of oil from *Fructus Gardeniae* via PKA-CREB-BDNF signaling [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(4): BSR20190141.
- [7] Wang C Y, Guo J Y, Guo R J. Effect of XingPiJieYu Decoction on spatial learning and memory and cAMP-PKA-CREB-BDNF pathway in rat model of depression through chronic unpredictable stress [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 73.
- [8] 罗琳. 从 MAPK/ERK 信号通路探讨补阳还五汤对卒中后抑郁大鼠海马神经再生的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [9] 蔡华. 畅郁逍遥散对脑卒中后抑郁 (PSD) 小鼠作用机理的实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2010.
- [10] 展淑琴, 高亚亚, 张凌峰, 等. 大鼠大脑中动脉永久性缺血和缺血再灌注模型的比较 [J]. *陕西医学杂志*,

- 2013, 42(6): 643-646.
- [11] Sicard K M, Fisher M. Animal models of focal brain ischemia [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2009, 1: 7.
- [12] Fluri F, Schuhmann M K, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 3445-3454.
- [13] Chiang T, Messing R O, Chou W H. Mouse model of middle cerebral artery occlusion [J]. *J Vis Exp*, 2011(48): 2761.
- [14] Qiao H, Li M X, Xu C, *et al.* Dendritic spines in depression: What we learned from animal models [J]. *Neural Plast*, 2016, 2016: 8056370.
- [15] Mei Z G, Huang Y G, Feng Z T, *et al.* Electroacupuncture ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the SIRT1-FOXO1 signaling pathway [J]. *Aging*, 2020, 12(13): 13187-13205.
- [16] Bogdanova O V, Kanekar S, D'Anci K E, *et al.* Factors influencing behavior in the forced swim test [J]. *Physiol Behav*, 2013, 118: 227-239.
- [17] Katz R J, Roth K A, Carroll B J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247-251.
- [18] Porsolt R D, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: A primary screening test for antidepressants [J]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1977, 229(2): 327-336.
- [19] Kim J S. Post-stroke mood and emotional disturbances: Pharmacological therapy based on mechanisms [J]. *J Stroke*, 2016, 18(3): 244-255.
- [20] Babkair L A. Risk factors for poststroke depression: An integrative review [J]. *J Neurosci Nurs*, 2017, 49(2): 73-84.
- [21] Villa R F, Ferrari F, Moretti A. Post-stroke depression: Mechanisms and pharmacological treatment [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 184: 131-144.
- [22] Dong L M, Sánchez B N, Skolarus L E, *et al.* Ethnic differences in prevalence of post-stroke depression [J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2018, 11(2): e004222.
- [23] Santos E B, Rodrigues R A P, Pontes-Neto O M. Prevalence and predictors of post stroke depression among elderly stroke survivors [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2016, 74(8): 621-625.
- [24] 孟瑶, 赵丹阳, 隋月皎. 血府逐瘀胶囊治疗冠心病疗效的 Meta 分析 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(9): 1990-1997.
- [25] 杨丽丽. 血府逐瘀汤治疗头痛临床体会 [J]. *光明中医*, 2022, 37(4): 693-695.
- [26] 王璐瑶, 张亚平, 穆琦瑄, 等. 基于超分子传感技术研究血府逐瘀汤对三甲胺结肠吸收的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53(6): 1783-1789.
- [27] 郑舒, 金博文, 李东娜, 等. 基于肠屏障功能探讨血府逐瘀胶囊防治卒中后抑郁作用研究 [J]. *中南药学*, 2022, 20(12): 2823-2830.
- [28] Gu S M, He Z M, Xu Q Y, *et al.* The relationship between 5-hydroxytryptamine and its metabolite changes with post-stroke depression [J]. *Front Psychiatry*, 2022, 13: 871754.
- [29] Cooperrider J, Chan H H, Gale J T, *et al.* BrdU-induced hyperlocomotion in the stroked rat [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 703: 96-98.
- [30] Park D, Xiang A P, Mao F F, *et al.* Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(12): 2162-2171.
- [31] Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: Function, identity and therapeutic implications [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(12): 2177-2195.
- [32] Hwang I K, Yoo K Y, Li H, *et al.* Differences in doublecortin immunoreactivity and protein levels in the hippocampal dentate gyrus between adult and aged dogs [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(9): 1604-1609.
- [33] Hwang I K, Yoon Y S, Choi J H, *et al.* Doublecortin-immunoreactive neuronal precursors in the dentate gyrus of spontaneously hypertensive rats at various age stages: Comparison with Sprague-Dawley rats [J]. *J Vet Med Sci*, 2008, 70(4): 373-377.
- [34] Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, *et al.* BDNF as a promising therapeutic agent in Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1170.
- [35] Shan D, Zheng Y D, Froud K. Brain-derived neurotrophic factor as a clinical biomarker in predicting the development of post-stroke depression: A review of evidence [J]. *Cureus*, 2021, 13(6): e15662.
- [36] Zhang E, Liao P. Brain-derived neurotrophic factor and post-stroke depression [J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(3): 537-548.
- [37] Chen F, Zhou C C, Yang Y, *et al.* GM1 ameliorates lead-induced cognitive deficits and brain damage through activating the SIRT1/CREB/BDNF pathway in the developing male rat hippocampus [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2019, 190(2): 425-436.
- [38] Li Y Z, Wu Z Y, Zhu B Q, *et al.* The BDNF-TrkB-CREB signalling pathway is involved in bisphenol S-induced neurotoxicity in male mice by regulating methylation [J]. *Toxics*, 2022, 10(8): 413.
- [39] Liu S, Li X H, Gao J M, *et al.* Icariside II, a phosphodiesterase-5 inhibitor, attenuates beta-amyloid-induced cognitive deficits via BDNF/TrkB/CREB signaling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(3): 985.
- [40] Xue W, Wang W, Gong T, *et al.* PKA-CREB-BDNF signaling regulated long lasting antidepressant activities of Yueju but not ketamine [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26331.

[责任编辑 李亚楠]